

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-236690

(43) 公開日 平成7年(1995)9月12日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 L 33/00	Z			
C 0 8 J 7/02	Z	7310-4F		
C 1 2 N 11/08	A			

審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平6-53304	(71) 出願人	000004503 ユニチカ株式会社 兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地
(22) 出願日	平成6年(1994)2月25日	(72) 発明者	戴下 安紀 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内
		(72) 発明者	高塚 旨寛 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内
		(72) 発明者	大杉 泰子 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内

(54) 【発明の名称】 線溶活性物質の固定化方法

(57) 【要約】

【構成】 表面にアミノ基（又はカルボキシル基）を有する材料を、カルボキシル基（又はアミノ基）を有する水溶性高分子化合物及び縮合剤を含有する水系媒体で処理し、次いで線溶活性物質及び縮合剤を含有する水系媒体で処理する。

【効果】 線溶活性物質の固定化のための全反応を水系媒体中で行うことができるので、材料の変形、寸法変化を起こすことなく効率よく線溶活性物質を固定化することができる。また、有機溶媒を使用するよりも安価であり、固定化処理後の有機溶媒の廃液処理の問題もなくなる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 表面にアミノ基を有する材料を、カルボキシル基を有する水溶性高分子化合物及び縮合剤を含有する水系媒体で処理し、次いで、線溶活性物質及び縮合剤を含有する水系媒体で処理することを特徴とする線溶活性物質の固定化方法。

【請求項2】 表面にカルボキシル基を有する材料を、アミノ基を有する水溶性高分子化合物及び縮合剤を含有する水系媒体で処理し、次いで、線溶活性物質及び縮合剤を含有する水系媒体で処理することを特徴とする線溶活性物質の固定化方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【産業上の利用分野】 本発明は、材料の変形、寸法変化を起こすことなく、材料の表面に効率よく線溶活性物質を固定化することができる線溶活性物質の固定化方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 近年、医療材料の分野において、高分子化合物が使われるようになったが、高分子化合物からなる材料を人工血管、カテーテル、人工腎臓、人工心臓、人工弁、人工肺等として直接血液と接する部位に使用した場合、血栓形成を引き起こすという問題があった。血栓形成は多くの血液凝固酵素の関与する一連の複雑な反応により、最終的にはフィブリノーゲンが不溶性のフィブリンに変化することを意味している。従来の抗血栓性材料の開発はこの血液凝固系に注目し、血液凝固系酵素の阻害剤として働くヘパリンを材料表面に適用し、フィブリノーゲンのフィブリンへの変化を阻害することによって効果が発現していくという欠点があった。

【0003】 そこで、いったん生成したフィブリンを溶解するウロキナーゼ等の酵素、すなわち、線溶活性物質を材料表面に固定化する方法が見出された。例えば、特開昭51-81876号公報にはポリアミドの表面に縮合剤を用いて線溶活性物質を結合させる方法が開示されている。この方法は、ポリアミドの末端のアミノ基又はカルボキシル基と線溶活性物質のカルボキシル基又はアミノ基を結合させる方法であり、アルカリ処理によりポリアミドの主鎖を切断して末端基をある程度増加させることによって、固定化量を増やすことが可能であるが、長期にわたり抗血栓性を維持させるためにはその固定化量では十分でなかった。そのため、特開昭52-90688号公報には、線溶活性物質の固定化量を増やすために、材料をポリアミン、次いでポリカルボン酸無水物で処理した後、線溶活性物質の溶液と接触させる方法が開示されている。この方法によると、線溶活性物質と結合可能な酸無水物基の数を大幅に増やすことができ、線溶活性物質の固定化量の大幅な増加がみられた。このポリカルボン酸無水物基を応用した固定化技術は、ポリエ

ステル（特開昭52-010378号公報）、ポリウレタン（特開昭53-106778号公報）、ポリビニルアルコール（特開昭53-129480号公報）等の材料表面に線溶活性を付与する方法としてすでに開示されている。

【0004】 しかしながら、このポリカルボン酸無水物を用いて処理するには、ポリカルボン酸無水物を有機溶媒に溶解しなくてはならない。これは、ポリカルボン酸無水物は水中に溶解させると酸無水物基が加水分解してジカルボン酸となり、線溶活性物質溶液との処理において反応不可能となるからである。ここで用いられる有機溶媒としてはアセトン、メチルエチルケトン等のケトン類、ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素等であり、基材となる高分子物質が例えばポリメタクリル酸メチル等のようにこれらの有機溶媒に可溶な場合、上記の処理は行うことが不可能であるし、ポリアミド、ポリウレタンのように不溶なものであっても有機溶媒によって膨潤し、材料本体の変形、寸法変化を引き起こす問題を有していた。また、従来、固定化反応を水系で行うことによる利点、例えば、有機溶媒の安全衛生上の問題、廃液処理コスト等についてを開示しているものは皆無であった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、水系媒体中で線溶活性物質を固定化することができて、上記のような問題点を解決することができる線溶活性物質の固定化方法を提供することを目的とするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、このような課題を解決するために鋭意検討の結果、材料としてアミノ基（又はカルボキシル基）を有する材料を、カルボキシル基（又はアミノ基）を有する水溶性高分子化合物と縮合剤を含有する水系媒体中で処理し、さらに、線溶活性物質及び縮合剤を含有する水系媒体で処理すると、材料の表面に効率よく線溶活性物質を固定化することができることを見出し、本発明に到達した。すなわち、本発明は、表面にアミノ基を有する材料を、カルボキシル基を有する水溶性高分子化合物及び縮合剤を含有する水系媒体で処理し、次いで、線溶活性物質及び縮合剤を含有する水系媒体で処理することを特徴とする線溶活性物質の固定化方法であり、また、表面にカルボキシル基を有する材料を、アミノ基を有する水溶性高分子化合物及び縮合剤を含有する水系媒体で処理し、次いで、線溶活性物質及び縮合剤を含有する水系媒体で処理することを特徴とする線溶活性物質の固定化方法を要旨とするものである。

【0007】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明において、アミノ基（又はカルボキシル基）を表面に有する材料としては、表面にアミノ基（又はカルボキシル基）をわずかでも有する水不溶性の有機高分子化合物で

あればいかなるものでもよい。ここでアミノ基とは、窒素原子に直接結合する水素原子を1個以上有する第一アミン又は第二アミンを示す。アミノ基（又はカルボキシル基）を表面に有する材料は、例えば高分子末端にカルボキシル基又はアミノ基を有するナイロン等のポリアミド、高分子末端にカルボキシル基を有するポリエチレンテレフタレート等のポリエステル、高分子側鎖にカルボキシル基又はアミノ基を有するものとしてアクリル酸、アリルアミン等を一成分として含む共重合体が挙げられ、また、高分子材料表面を加水分解することにより、末端又は側鎖にカルボキシル基又はアミノ基を生成することが可能なポリウレタン、ポリメタクリル酸メチル等が挙げられる。更に高分子中にカルボキシル基又はアミノ基を含まなくてもグロー放電処理やコロナ放電処理のように有機溶媒を用いない手段により上記官能基を表面に導入できるものであってもかまわない。

【0008】上記に示した高分子化合物は単体である必要はなく、上記高分子化合物と他の高分子と混合したもの、又は他の高分子や金属等の表面を上記した高分子化合物でコーティングしたものであってもよい。アミノ基又はカルボキシル基を有する水溶性高分子化合物としては、アミノ基又はカルボキシル基を1分子中に少なくとも3個以上含む水溶性の高分子化合物であればよいが、1分子中に10個以上有することが望ましい。このような高分子化合物として、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリエチレンイミン等の他に、アクリル酸、メタクリル酸、マレイン酸、4-アミノスチレン、アリルアミン、4-ビニル安息香酸等のアミノ基又はカルボキシル基を有するモノマーとアクリルアミド、N、N-ジメチルアクリルアミド、2-ヒドロキシエチルメタクリレート等の親水性モノマーとの共重合体等、さらにアミノ酸の1種であるグルタミン酸、アスパラギン酸、リシン等の重合体が挙げられる。またこれらの水溶性高分子化合物は、水に対する溶解性を増大させるために一部のアミノ基又はカルボキシル基が例えば塩酸塩、ナトリウム塩等の塩化合物であってもよい。

【0009】本発明における線溶活性物質とは、フィブリンの溶解に関与する酵素であり、血栓中に含まれる不溶性のフィブリンを溶解する作用を有する。例えば、プラスミン、プリノーゼ、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲン・アクチベーター等が挙げられる。

【0010】縮合剤は、材料表面のアミノ基（又はカルボキシル基）と水溶性高分子化合物のカルボキシル基（又はアミノ基）とを、水溶性高分子化合物のカルボキシル基（又はアミノ基）と線溶活性物質のアミノ基（又はカルボキシル基）とを脱水反応により結合させる機能を有するものであり、例えば、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド・塩酸塩、1-シクロヘキシル-3-（2-モルホリノ-4-エチ

ル）カルボジイミド-メト-p-トルエンスルホネート、N-シクロヘキシル-5-フェニルイソオキサゾリウム-3'-スルホネート、N、N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド等が挙げられる。水不溶性の縮合剤の場合は水系媒体中に分散して用いることも可能であるが、縮合剤は水溶性であるものが好ましい。

【0011】本発明においては、表面にアミノ基（又はカルボキシル基）を有する材料を、カルボキシル基（又はアミノ基）を有する水溶性高分子化合物及び縮合剤を含有する水系媒体で処理し、次いで、線溶活性物質及び縮合剤を含有する水系媒体で処理することによって固定化するものである。

【0012】次に、固定化方法を詳細に説明する。まず、カルボキシル基（又はアミノ基）を有する水溶性高分子化合物を純水又はpH緩衝溶液に溶解し、その中に縮合剤の水溶液を添加して水溶性高分子化合物のカルボキシル基（又はアミノ基）を活性化させた後、この溶液で材料の処理を行い、材料表面のアミノ基（又はカルボキシル基）と水溶性高分子化合物のカルボキシル基（又はアミノ基）とを脱水反応により結合させる。この溶液の水溶性高分子化合物の濃度は10重量%以下が好ましく、さらには0.01～5重量%がより好ましい。また、縮合剤の水溶液の濃度は10重量%以下が好ましい。また、この反応は、任意の温度で行うことが可能であるが、50℃以下で行われるのが好ましく、0～20℃がより好ましい。水溶性高分子化合物水溶液を材料表面に接触させた後は、必要に応じて純水、又は、希酸による洗浄、乾燥を行うが、直接次の工程に進んでもかまわない。

【0013】このようにして材料の表面を水溶性高分子化合物及び縮合剤を含有する水系媒体で処理した後、線溶活性物質及び縮合剤を含有する生理食塩水溶液等の水系媒体で処理して、水溶性高分子化合物によって導入されたカルボキシル基（又はアミノ基）と線溶活性物質のアミノ基（又はカルボキシル基）とを結合させる。

【0014】線溶活性物質及び縮合剤を含有する水系媒体は、必要に応じてpH又は塩濃度等を調節して用いられる。

【0015】この水系媒体で処理するための条件は、温度を37℃以下に保つのが好ましく、0～10℃に保つとより好ましい。また、必要に応じて、攪拌、振とう等の手段を用いて表面を更新するのが好ましい。

【0016】本発明により表面に線溶活性が固定化された材料は、従来の方法によって得られるものよりもカルボキシル基又はアミノ基が多く高活性を示し、その効果も長時間維持される。そして、血液がこれらの材料の表面に接触した際、優れた抗血栓性を示すので、人工血管、カテーテル、人工心臓、人工肺、人工腎臓等としての医療材料として有効である。

【0017】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明する。

【0018】実施例1

1 cm角のナイロン6フィルムを2.5 N塩酸に浸し、30℃で30分間処理した。一方、ポリアクリル酸（和光純薬社製）の水溶液を濃度0.2重量%、pH4.0に調製し、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド・塩酸塩（WSC；同仁化学社製）を濃度0.05重量%になるように加え、この溶液に上記フィルムを24時間浸漬（5℃以下）した後、希酸、および純水で洗浄し、乾燥して、ポリアクリル酸処理フィルムを得、以下の処理を氷浴中で行った。1/10M-リン酸緩衝溶液（pH5.0）と生理食塩水との等容量混合液にWSCを0.26 mg/mlになるように加え、この液にポリアクリル酸処理フィルムを浸し、10分間攪拌した。次いで、ウロキナーゼ（ミドリ十字社製）を最終濃度1500国際単位/mlになるように添加し、5℃以下で48時間放置した。このように処理したフィルムを純水で洗浄、乾燥させ、ウロキナーゼ固定化ナイロンフィルムを得た。このフィルムのウロキナーゼ活性を合成基質法（Morita et al, J. Biochem., 82, 1495 (1977)）により測定したところ、9.7国際単位/cm²であった。

【0019】比較例1

比較のために上記実施例1においてポリアクリル酸処理を行わず、他は実施例1と同様の条件でナイロン6フィルムを処理し、ナイロン6フィルムの表面のアミノ基又はカルボキシル基に直接ウロキナーゼを固定化したものを得た。このフィルムのウロキナーゼ活性は、0.3国際単位/cm²であった。

【0020】実施例2

外径1.6 mm、内径1.0 mm、長さ30 cmのポリウレタン製チューブを80℃の純水で6時間処理し、純水で洗浄、乾燥した。次いで、ポリアクリル酸（和光純薬社製）の水溶液を濃度0.2重量%、pH4.0に調製し、WSCを濃度0.05重量%になるように加え、この溶液に上記チューブを24時間浸漬（5℃以下）、希酸、および純水で洗浄し、乾燥してポリアクリル酸処理チューブを得、以下の処理を氷浴中で行った。1/10M-リン酸緩衝溶液（pH5.0）と生理食塩水との等容量混合液にWSCを0.15 mg/mlになるように加え、この液に前記のように処理を行ったチューブを浸し、10分間放置し、次いで、ウロキナーゼ（ミドリ十字社製）を最終濃度1500国際単位/mlになるように添加し、5℃以下で24時間放置した後、純水で洗浄、乾燥し、ウロキナーゼ固定化チューブを得た。このチューブのウロキナーゼ活性を実施例1と同様の方法で測定したところ、3.2国際単位/cm²であった。

【0021】実施例3

外径2.0 mm、内径1.5 mm、長さ50 cmのポリウレタン製チューブを80℃の純水で6時間処理し、純水で洗浄、乾燥した。次いで、ポリアクリル酸（和光純薬社製）の水溶液を濃度0.2重量%、pH4.0に調製し、WSCを濃度0.05重量%になるように加え、この溶液に上記チューブを30時間浸漬した（5℃以下）後、希酸、および純水で洗浄し、乾燥して、ポリアクリル酸処理チューブを得、以下の処理を氷浴中で行った。1/10M-リン酸緩衝溶液（pH5.0）と生理食塩水との等容量混合液にWSCを0.3 mg/mlになるように加え、この液に前記処理を行ったチューブを浸し、10分間放置した。次いで、組織プラスミノゲンアクチベーター（Genentech 社製）を最終濃度0.1 mg/mlになるように添加し、5℃以下で24時間放置後、チューブを純水で洗浄、乾燥させ組織プラスミノゲンアクチベーター固定化チューブを得た。このチューブに固定化された組織プラスミノゲンアクチベーターのフィブリン溶解活性を金井等の方法（「臨床検査法提要」改訂第27版，金原出版，VI-100）を参照して測定した。すなわち、長さ2 mmの試料片をフィブリン平板上にのせ、37℃で24時間インキュベートした後のフィブリン膜の溶解円の径を測定した。試料片を中心に直径14.5 mmのフィブリンが溶解した。

【0022】実施例4

1 cm角のナイロン6フィルムを2.5 N塩酸に浸し、30℃で30分処理した。次いで、ポリエチレンイミン（ナカライテスク社製）の水溶液を濃度1重量%、pH8.0に調製し、WSCを濃度0.44重量%になるように加え、この溶液に上記フィルムを24時間浸漬（5℃以下）した後、純水で洗浄し、乾燥してポリエチレンイミン処理フィルムを得、以下の処理を氷浴中で行った。1/10M-リン酸緩衝溶液（pH5.0）と生理食塩水との等容量混合液にウロキナーゼ（ミドリ十字社製）を濃度1500国際単位/mlになるように加え、この液に前記ポリエチレンイミン処理を行ったフィルムを浸し、WSCを0.26 mg/mlになるように加えて72時間放置した後、純水で洗浄、乾燥させ、ウロキナーゼ固定化ナイロンフィルムを得た。このフィルムに固定化されたウロキナーゼのフィブリン溶解活性を実施例3と同様の方法で測定したところ、5 mm角の試料片を中心に直径10.6 mmのフィブリンが溶解した。

【0023】実施例5

外径1.6 mm、内径1.0 mm、長さ50 mmのポリウレタン製チューブを80℃の純水で6時間処理し、純水で洗浄、乾燥した。これとは別に、無水マレイン酸-メチルビニルエーテル共重合体（五協産業社製，Gantrez AN-119）1 gを100 mlの水に分散させ、40℃で一昼夜攪拌し溶解させた。この溶液に水酸化ナトリウム溶液を加えpH4.0に調製し、WSCを濃度0.05重量%になるように加え、上記チューブを24時間浸漬

(5)

した（5℃以下）た後、希酸、および純水で洗浄し、乾燥後、以下の処理を氷浴中で行った。1/10M-リン酸緩衝溶液（pH 5.0）と生理食塩水との等容量混合液にWSCを0.15mg/mlになるように加え、この液に前記処理を行ったチューブを浸し、10分間放置し、次いで、組織プラスミノゲンアクチベーター（Genentech 社製）を最終濃度0.1mg/mlになるように添加し、5℃以下で24時間放置した後、純水で洗浄、乾燥し、組織プラスミノゲンアクチベーター固定化チューブを得た。このチューブに固定化された組織プラスミノゲンアクチベーターのフィブリン溶解活性を

実施例3と同様の方法で測定したところ、長さ2mmの試料片を中心に直径13.3mmのフィブリンが溶解した。

【0024】

【発明の効果】本発明によれば、線溶活性物質の固定化のための全反応を水系媒体中で行うことができるので、材料の変形、寸法変化を起こすことなく効率よく線溶活性物質を固定化することができる。また、有機溶媒を使用するよりも安価であり、固定化処理後の有機溶媒の廃液処理の問題もなくなる。